



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 5/08, C12M 3/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO98/32840</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1998年7月30日(30.07.98)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/00244 <b>(22) 国際出願日</b> 1998年1月22日(22.01.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/24517 1997年1月24日(24.01.97) JP 特願平9/54300 1997年2月24日(24.02.97) JP 特願平9/143002 1997年5月19日(19.05.97) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 旭メディカル株式会社(ASAHI MEDICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区内幸町1丁目1番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 澄田政哉(SUMITA, Masaya)(JP/JP) 〒870-03 大分県大分市大字里2344-5 Oita, (JP) 寺嶋修司(TERASHIMA, Shuji)(JP/JP) 〒870-03 大分県大分市大字久原460-703 Oita, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: METHOD FOR SEPARATING CELLS</b>  <b>(54)発明の名称</b> 細胞分離方法  <b>(57) Abstract</b> A method for separating cells which involves the steps of introducing a cell-containing liquid containing the cells to be collected together with the cells to be eliminated into cell-capture means capable of substantially capturing the cells to be collected while passing the cells to be eliminated therethrough; discarding the liquid containing the cells to be eliminated from the means; and introducing a liquid having a viscosity of from 5 mPa.s to 500 mPa.s into the cell-capture means to thereby recover the cells to be collected, which have been captured in the cell-capture means, therefrom.		

回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、該回収必要細胞を実質的に捕捉し該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手段に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	TD	チャード
AU	オーストラリア	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GU	グアム	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HN	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CF	中央アフリカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボアール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CN	中国	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CC	クウェート	KR	韓国	RU	ロシア		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
CZ	チェコ	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
EE	エストニア	LS	レソト	SK	スロヴァキア		
				SL	シエラレオネ		

## 明 細 書

## 細胞分離方法

## 5 技術分野

本発明は各種の細胞の混合溶液から必要な細胞のみを分離、回収する方法に関する。得られた細胞は造血幹細胞移植療法等、細胞を用いて行う各種疾病の治療及び免疫学や細胞生物学等の基礎科学分野で用いることが可能となる。

## 背景技術

- 10 白血球（顆粒球、単球、リンパ球）と赤血球とを含んだ血液等の体液からフィルターに白血球を捕捉し、リンパ球を回収する技術に関しては、特開昭54-119012号公報等が知られている。

- ところで、造血幹細胞移植において、臍帯血幹細胞は、ドナー侵襲をひきおこさない造血幹細胞のソースとして注目を集めており、欧米諸国を中心に盛んにその臨床応用が試みられている。臍帯血幹細胞は、他の造血幹細胞移植、すなわち
- 15 骨髓移植又は末梢血幹細胞移植のようにドナーから採取されてすぐ患者に移植されることはまれであるので、採取時から使用時まで保存しておくことが必要である。特に非血縁者間移植の場合などは、そのような保存を必要とすることが多い。臍帯血は凍結保存に際し、解凍後に破壊される赤血球による副作用を防止し、凍
- 20 結保存時の体積を小さくする目的で、有核細胞を分離し、赤血球を除去すべきであるとされており、現在はほとんどの場合に分離保存が行われている（南江堂、「末梢血幹細胞移植」、第173ページ）。特公平8-69号公報には、臍帯血をフィコールハイパキュー法（比重液による遠心分離法であり、以下これをフィコール法と略す）で分離するためのプロトコルの詳細が開示されている。しか
- 25 しながら、フィコール法は実験室レベルの、非常に煩雑で長時間を要する操作であるという問題がある。また、WO96/17514公報には、ヒドロキシエチルスターチを用いて臍帯血中の赤血球を凝集沈降分離し、有核細胞濃厚液を得るためのバッグシステム、方法及びその方法により得られた細胞液が開示されている。本法は煩雑な操作を少なくするという点では従来のフィコール法と比べ若干

の改善となっているが、遠心分離が2回必要であるため、やはり長時間の作業を要することになる。

一方、フィコール法や赤血球凝集除去に代わる造血幹細胞分離方法も散見されるようになった。特開平8-104643号公報には、赤血球を通過させるフィルターに造血幹細胞を捕捉させた後、最初の通液方向とは逆方向の液流を惹起させて造血幹細胞を回収する方法が開示されている。しかしながら回収のための液体としてはHBSS（ハanks液）が用いられているにすぎなかった。

デキストランはモノマーとしてのグルコースを、主として $\alpha-1, 6$ 結合によって結合させた多糖類であり、古くから白血球分離剤として用いられてきた。しかしながら、デキストランによる白血球の分離は、試験管内の赤血球を凝集沈降させ、必要に応じ遠心分離し、上清の白血球をピペットで回収するというデキストランの赤血球凝集剤としての作用を利用するものである（三輪史朗編集、臨床検査技術全書、第3巻、「血液検査」、第425ページ）。しかし、ヒドロキシエチルデンプン等も同様の赤血球凝集作用があり、このような作用はデキストラン固有の性質ではない。

次に、造血幹細胞分離システムについて述べる。特開平7-184991号公報には臍帯血採取用器具が開示されており、特に、血液採取用容器の前に、臍帯血中の異物であるマイクロアグリゲートなどの凝集塊、組織片、骨片、脂肪塊等を除去するためのフィルターが開示されている。しかしながら、このフィルターは異物の除去が目的であり、回収を必要とする細胞の捕捉を目的としたものではない。また、仮に、該フィルターに造血幹細胞を捕捉することができる材料が偶然用いられたとしても、上記特開平第7-184991号公報には捕捉された造血幹細胞を回収するという記載は全くない。また、特開平8-52206号公報には、採取した臍帯血から造血幹細胞を分離することを目的とした臍帯血採取用装置として膜型の血漿分離器を含む装置が開示されている。同公報には別の分離法として密度勾配分離、即ち、フィコール法による分離のための装置を用いる方法も開示されている。

本発明は、簡便な操作かつ短時間の操作で、回収を必要とする細胞（以下、回収必要細胞又は必要細胞と略す）と不要な細胞（以下、除去対象細胞と略す）と

の混合物から必要細胞を高率で回収する方法、さらに詳しくは、細胞混合溶液から必要細胞をいったんフィルター等の細胞捕捉手段に捕捉させ、その捕捉された細胞を高率で回収する細胞分離方法、並びにその方法を実際に臨床現場で使用するために具現化した回路システム及びそれに用いる回収液、さらにそれらにより

5 得られる細胞含有液を提供することを目的とする。

本発明者らは従来の技術が有する問題点を解決すべく、細胞捕捉手段から細胞を回収する回収液の性状に着目して鋭意検討を重ねた結果、一定の粘度を有する回収液を用いて細胞回収操作を行うと、高い回収率が得られることを見出し、また、様々な回収液の組成について鋭意検討を重ねた結果、デキストランを含む生

10 理的溶液で細胞の回収を行うと、きわめて高い回収率が得られるという驚くべき効果を見出し、本発明を完成させたものである。

#### 発明の開示

すなわち、本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段

15 に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法である。

また本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要

20 細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段より回収し、その後回収した細胞を保存する工程を含む細胞分離保存方法である。

25 また本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段から回収し、次いで回収した細胞

を凍結保存し、その後凍結保存した細胞を解凍する工程を含む細胞分離保存方法である。

また本発明は、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる、少なくとも入口と出口とを有する細胞捕捉手段と、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を細胞捕捉手段に注入する回路と、細胞捕捉手段の出口より下流に接続される細胞捕捉手段に液体を注入する回路と、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される細胞捕捉手段の入口側から細胞を回収する回路とからなる細胞分離システムである。

また本発明は、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を通過させる細胞捕捉手段に細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路を通じて回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を導入し、細胞捕捉手段の出口から除去対象細胞含有液を導出させ、次いで前記細胞捕捉手段の出口より下流に接続される回路から  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体を細胞捕捉手段に導入し、細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路から回収する工程を含む細胞分離方法である。

また本発明は、実質的に赤血球および／または血小板を含まない  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する造血幹細胞含有液である。

また本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に  $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法によって得られた実質的に除去対象細胞を含まない回収必要細胞含有液である。

また本発明は、 $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以上  $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  以下の粘度を有する液体である、細胞捕捉手段から捕捉された細胞を回収するための回収用液体である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は本発明による細胞分離システムの 1 実施態様である。

図 2 は実施例 1 で用いた細胞分離システムの模式図である。

図3は実施例4で用いた細胞分離システムの模式図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で言う回収必要細胞とは分離回収して何らかの用途に用いる細胞を言い、  
除去対象細胞とは先述の用途には不要であるか、または何らかの病因細胞である  
5 等の理由で、回収必要細胞に混入することが問題となるため積極的に除去するこ  
とが必要である細胞のことを言う。

これらを含む細胞含有液としては、末梢血、骨髓、臍帯血（臍帯血管から採取  
されたものだけでなく、胎盤血管から採取されたものも含む）、リンパ液及びこ  
れらに遠心分離等何らかの処理を施したもの、あるいは各種臓器や組織から抽出  
10 した細胞を何らかの液体に再浮遊させたものが挙げられる。

有核細胞とは細胞内に核を有する細胞のことを言い、たとえば白血球、顆粒球、  
好中球、好塩基球、好酸球、骨髓球、赤芽球、リンパ球、Tリンパ球、ヘルパー  
Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、サブレッサーTリンパ球、Bリンパ球、N  
K細胞、NK T細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、破骨細胞、骨芽細胞、  
15 骨細胞、造血幹細胞、繊維芽細胞、軟骨芽細胞等が挙げられる。

造血幹細胞含有単核球分画とは、造血幹細胞および／または造血前駆細胞（以  
下、これらをまとめて単に造血幹細胞と略す）を含有する単核球集団のことであ  
る。単核球とは細胞内に核が1個存在する細胞の総称であり、具体的にはリンパ  
球（T細胞、B細胞、NK細胞）、単球、造血幹細胞、骨髓球、芽球等が挙げら  
20 れる。この単核球集団の造血幹細胞含有率は通常、0.01%～99%であり、  
原料細胞集団の種類、細胞処理の有無によりその含有率は異なる。造血幹細胞含  
有率は、たとえば、正常人末梢血中では通常0.01%前後であり、臍帯血では  
0.05～1.0%であり、骨髓では0.5～2%である。また、G-CSF  
（顆粒球コロニー刺激因子）を投与された末梢血では造血幹細胞含有率は個人差  
25 が著しく、0.1%から数%である。モノクローナル抗体による細胞分離、とく  
にフローサイトメトリー法による分離を行った場合、造血幹細胞含有率は99%  
にも達する場合がある。いずれにせよ、造血幹細胞含有単核球分画という語は造  
血幹細胞の含有率を何ら具体的に規定するものではない。

本発明で言う核を持たない細胞としては、たとえば赤血球、血小板が挙げられ

る。

本発明で言う「除去対象細胞が回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する」とは、たとえば回収必要細胞がヘルパーTリンパ球（表面マーカーとして抗CD4抗原を有する）で、除去対象細胞がサプレッサーTリンパ球（表面マーカーとして抗CD8抗原を有する）のように有核細胞という点では同一だが、表面マーカーが異なる（回収必要細胞と除去対象細胞は異なる亜集団に属する）ことを言う。

回収必要細胞が有核細胞であり、除去対象細胞が核を持たない細胞である場合の組み合わせとその用途の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

- 10 1. 回収必要細胞：白血球、除去対象細胞：赤血球、用途：インターフェロン製造
2. 回収必要細胞：リンパ球、除去対象細胞：赤血球及び血小板、用途：養子免疫療法
3. 回収必要細胞：造血幹細胞含有単核球分画、除去対象細胞：赤血球及び血小板、用途：造血幹細胞移植

また、回収必要細胞が有核細胞であり、除去対象細胞が回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する有核細胞である場合の組み合わせとその用途の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

1. 回収必要細胞：CD34陽性有核細胞、除去対象細胞：CD34陰性有核細胞、用途：CD34陽性細胞移植
2. 回収必要細胞：CD8陽性Tリンパ球、除去対象細胞：CD8陰性Tリンパ球、用途：養子免疫療法

また、回収必要細胞が有核細胞であり、除去対象細胞が核を持たない細胞及び回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する有核細胞である場合の組み合わせとその用途の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

1. 回収必要細胞：CD34陽性有核細胞、除去対象細胞：赤血球、血小板、CD34陰性有核細胞、用途：CD34陽性細胞移植
2. 回収必要細胞：CD8陽性Tリンパ球、除去対象細胞：赤血球、血小板、CD8陰性Tリンパ球、用途：養子免疫療法



本発明における、少なくとも回収必要細胞は捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段としては、例えば、回収必要細胞を捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる材料を充填した液体流入口と液体流出口とを有する容器、あるいは容器内面に細胞捕捉面が存在する成形容器が挙げられる。回収必要細胞

5 を捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる材料は、回収必要細胞を選択的に捕捉できる限り通常用いられている細胞捕捉材であればいかなる材料も使用できるが、成型性、滅菌性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン等の合成高

10 分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ヒドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属が挙げられる。

また、これらの捕捉材はそのままでも使用することができるが、細胞の選択的通過または捕捉を行う等の必要に応じて表面改質を施したものでよい。例えば、

15 血小板通過性を高めるにはWO 87/05812 公報で提案されている非イオン性親水基と塩基性含窒素官能基とを有するポリマーのコートによる方法等が挙げられる。細胞の選択的捕捉を行う場合、その方法として、アミノ酸、ペプチド、糖類、糖タンパク（抗体、接着分子等のバイオリガンドを含む）といった特定の細胞に親和性のあるリガンドを、例えば特開平2-261833号公報で提案さ

20 れているハロアセトアミド法により固定する方法等が挙げられる。

また、捕捉材の形状としては、粒状、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状構造体、平板等が挙げられるが、体積あたりの表面積が大きいという点で粒状、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状構造体が好ましく、取り扱い性の点から、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状構造体といった多孔質構造体がさらに好ましく、なか

25 でも不織布、スポンジ状構造体が細胞液の流れ性、製造性の点から最も好ましい。

不織布を用いる場合、抗CD34モノクローナル抗体等の特定の細胞に特異的に結合するいわゆるバイオリガンド類を表面に固定しないときは、通常、繊維径は1.0  $\mu\text{m}$ 以上30  $\mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは1.0  $\mu\text{m}$ 以上20  $\mu\text{m}$ 以下であり、さらにより好ましくは1.5  $\mu\text{m}$ 以上10  $\mu\text{m}$ 以下である。1.0  $\mu\text{m}$ 未

満では回収必要細胞が強固に捕捉されてしまい回収困難となる可能性があり、好ましくない。30  $\mu\text{m}$ を超えると、回収必要細胞が繊維に捕捉されず素通りする可能性が高くなる。いずれの場合でも回収率の低下につながるおそれがあるので好ましくない。

- 5 また、スポンジ状構造体を用いる場合、孔径は通常2.0  $\mu\text{m}$ 以上25  $\mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは3.0  $\mu\text{m}$ 以上20  $\mu\text{m}$ 以下であり、さらにより好ましくは4.0  $\mu\text{m}$ 以上15  $\mu\text{m}$ 以下である。2.0  $\mu\text{m}$ 以下では流れ性が著しく劣り、通液自体が困難になるおそれがあり、また25  $\mu\text{m}$ を超えると回収必要細胞の捕捉率が低下し、回収率の低下を招くので好ましくない。
- 10 回収必要細胞を捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる材料を充填する容器の材質としては、成型性や滅菌性に優れ、細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン、塩化ビニル等の合成高分子、ヒドロキシアパタイト、ガラス、アルミ
- 15 ナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、細胞捕捉材を充填した容器以外の細胞捕捉手段の例である、容器内面に細胞捕捉面が存在する成形容器としては、例えばフラスコ、ディッシュ、コニカルチューブ、シリンジ、血液バッグが挙げられる。

- 20 本発明で言う「回収必要細胞は実質的に捕捉する」とは細胞含有液中の回収必要細胞の60%以上を捕捉することを言い、また「除去対象細胞を実質的に通過させる」とは細胞含有液中の除去対象細胞の60%以上を通過させることを言う。

- 本発明においては細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を特定粘度の液体（以下、回収液または回収用液体とも言う）で回収するが、この液体の粘度は
- 25 5  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上500  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下であることが必要であり、好ましくは5  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上100  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下、より好ましくは7  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上50  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下である。粘度が5  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 未満では回収率が低く、500  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ を超えると、たとえポンプを用いたとしても、通液が著しく困難となり、作業性が劣る。また、圧力の上昇が起こり、回路内のチューブ接続部がリークする

可能性もあり好ましくない。なお、粘度の測定方法としては回転粘度計を用いる方法が最も簡便、かつ精度もよく好ましい。

回収液としては、細胞への悪影響が少ないものであればいずれの液体も使用でき、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子溶液、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシセルデンブ  
5 コール等、デキストラン、キチン誘導体、コラーゲン、フィブロネクチン、アルブミン、グロブリン等の天然高分子溶液、グルコース、サッカロース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、グリセリン、ジメチルスルホキシド、シリコンオイル等の有機物溶液及びこれらの混合物が挙げられる。本発明者らの検討で  
10 は、デキストランの使用により特に優れた回収率が得られているので、以下デキストランについて詳細に説明する。

本発明で言うデキストランとは、グルコースのポリマーで、グルコースの大部分が $\alpha-1, 6$ 結合で結合しているものを言い、その部分加水分解物や硫酸エステル等の誘導体も包含される。分子量は制限がないが、溶解性や入手しやすさ等  
15 を考慮し、好ましい平均分子量は1000～1000万であり、より好ましくは5000～500万、さらに好ましくは1万～100万である。分子量により同一濃度でも粘度が異なるので、粘度が5 mPa・s以上500 mPa・s以下になるように分子量または濃度を適宜調整する。医薬品として認可済みの、滅菌済みデキストラン40注（平均分子量約4万のデキストランの10 w/v %生理食  
20 塩水溶液）が市販されているのでこれを好適に用いることができる。また、5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度にするためにはデキストランのみを用いてもよく、または他の物質を混在させてもよい。その物質をいくつか例示すると、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシセルデンブ、デ  
25 キストラン、キチン誘導体、コラーゲン、フィブロネクチン、アルブミン、グロブリン等の天然高分子、グルコース、サッカロース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、グリセリン、ジメチルスルホキシド等の有機物が挙げられる。デキストランの使用で、細胞の高率回収が如何なるメカニズムにより達成できるかは現時点では不明であるが、本発明者らはデキストランが細胞の捕捉材への接着

性を減弱させる性質を持っているのではないかと想定している。

5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する液体を調製する際に溶質を溶かす溶媒としては、生理食塩水、D-PBS（ダルベッコリン酸塩緩衝液）、HBSS（ハanks液）等の緩衝液、RPMI 1640などの培地が挙げられる。また、これらの液体には栄養補給、細胞膜保護、抗凝固作用付与等の必要に応じ、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、アルブミン、グロブリン、グルコース、サッカロース、トレハロース、グロブリン、CPD（citrate-phosphate-dextrose）、ACD（acid-citrate-dextrose）、EDTA、ヘパリン等を添加しても良い。

また、本発明による特定の粘度を有する液体はこのまま回収必要細胞の凍結保存または液状保存に用い得るものであることがより好ましい。すなわち、前述したように造血幹細胞移植、特に臍帯血を用いる造血幹細胞移植では、フィコール法等により赤血球が除去された細胞集団を洗浄後（フィコール液は毒性があるため）、これに凍害保護剤等を添加して細胞浮遊液を調製し、これを液体窒素中または冷凍庫内で実際に使用されるまで凍結保存することが行われる。本発明においては、特定の粘度を有する回収用液体として、保存に使用し得るもの、特に凍結保存に使用し得るものを用いることにより、細胞分離後に煩雑な操作を加えることなく、保存用の細胞浮遊液を調製することができる。凍結保存に使用し得る回収用液体とは、具体的には凍害保護剤、栄養成分、細胞膜保護成分等としても用いられるものが挙げられる。凍害保護剤はその作用機序により、1）細胞外凍害保護剤と2）細胞内凍害保護剤とに分類される。1）としてはヒドロキシエチルデンプン、デキストラン、ポリビニルピロリドン等の水溶性ポリマーが一般に用いられており、2）としてはジメチルスルホキシド、グリセリン等の低分子有機化合物が通常、用いられている。また、栄養成分としてはグルコースなどの糖類、各種細胞培養用培地が挙げられる。また、細胞膜保護成分としては一般にアルブミンが用いられている。さらに、栄養成分と細胞膜保護成分とを合わせたものとして血漿が用いられることもある。先述したように、本発明の特定粘度を有する回収用液体はこれらの成分を単独または組み合わせて用いることがより好ま

しい。また、細胞回収後、例えば凍結保存時に上記成分を追加してもよい。

- 凍結方法としては、一般に $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーを用いる簡便法あるいはプログラムフリーザーにより徐冷し、液体窒素中に保存する方法の2種類が用いられている。また、凍結保存した細胞を解凍する方法としては、 $37^{\circ}\text{C}$ での
- 5 温浴での急速解凍が一般的に行われている。

- 本発明で言う細胞含有液を細胞捕捉手段に導入する方法としては、該手段にチューブを介して細胞含有液を入れたバッグまたはボトルを接続して落差、ローラーポンプ、バッグを押しつぶし液流を惹起させること、などにより導入するか、細胞含有液を入れたシリンジを接続し、手で押すかシリンジポンプなどの装置を
- 10 用いて送液すればよい。手で押す場合は簡便という特徴があり、装置を用いる場合、回収液導入の流速の制御が容易という特徴があるので、目的に応じそれぞれ適宜方法を選択すれば良い。

- 細胞含有液を細胞捕捉手段に導入すると、回収必要細胞は該手段内に捕捉され、除去対象細胞は該手段から流出するが、若干容器内にも残存する場合があるので、
- 15 残存した微量の除去対象細胞を洗浄除去する目的で前記手段にリンス液を導入して洗浄することが好ましい。リンス液としては生理的溶液であればいかなるものも使用可能であるが、いくつか例示すると、生理食塩水、ダルベッコリン酸緩衝液(D-PBS)やハanks液(HBSS)などの緩衝液、RPMI 1640などの培地が挙げられる。これらの生理的溶液に、栄養補給、細胞膜保護、抗凝固
- 20 作用付与等の必要に応じ、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、アルブミン、グロブリン、グルコース、サッカロース、トレハロース、グロブリン、CPD(citrate-phosphate-dextrose)、ACD(acid-citrate-dextrose)、EDTA、ヘパリン等を添加しても良い。リンス液の送液方向は細胞含有液を導入した方向と同一方向、その逆方向の2通りがあるが同一方向が好ましい。逆方向ではこの洗浄操作により、
- 25 捕捉されている回収必要細胞が漏出してしまうおそれがある。また、リンス液の粘度は $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であることが好ましい。 $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上では捕捉されている回収必要細胞が漏出してしまうおそれがある。

本発明における、前記細胞捕捉手段に $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $500\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下